



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

신생 생쥐의 망막혈관 발달시기에
따른 Tip cell 의 변화

**Chronologic Changes of Tip Cells
during the Development of Retinal
Vasculature in Newborn Mice**

2014년 2월

서울대학교 대학원

의학과 안과학 전공

조 창 식

의학석사 학위논문

신생 생쥐의 망막혈관 발달시기에
따른 Tip cell 의 변화

**Chronologic Changes of Tip Cells
during the Development of Retinal
Vasculature in Newborn Mice**

2014년 2월

서울대학교 대학원

의학과 안과학 전공

조 창 식

신생 생쥐의 망막혈관 발달시기에 따른 Tip cell 의 변화

지도교수 유영석

이 논문을 조창식 석사학위논문으로 제출함

2013 년 10 월

서울대학교 대학원

의학과 안과학 전공

조 창 식

조창식의 의학석사 학위논문을 인준함

2013 년 12 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문 초록

서론: 망막혈관은 단계적으로 발달하며 혈관 형성 부위 말단에 tip cell 이 나타난다. 신생 생쥐에서 망막혈관의 발달시기별 tip cell의 변화를 확인하고자 한다.

방법: 신생 생쥐의 안구를 생후 4일, 8일, 12일째 적출하여 파라핀 블록을 만들고 4 μ m 망막 절편에 헤마톡실린-에오신 염색과 PECAM-1 항체를 사용한 면역염색을 시행하였다. 또한 생후 4일, 6일, 8일째 적출한 안구에서 망막만을 분리하여 전 조직표본(wholemout) 망막을 만든 후 PECAM-1, collagen type IV, isolectin B4 항체를 사용하여 면역 형광염색을 시행하였다. 망막혈관의 tip cell의 존재와 망막혈관 발생시기에 따른 tip cell의 수를 비교하며 그 형태를 관찰하였다.

결과: Tip cell을 관찰할 수 있는 망막표면 혈관의 발생시기는 생후 8일째까지였으며, isolectin B4 항체로 tip cell을 관찰할 수 있었다. 생후 4일, 6일, 8일째 망막을 염색하여 tip cell의 수와 형태를

확인한 결과, 생후 4일째보다 생후 6일째 tip cell의 수가 증가를 하였으나, 생후 8일째는 생후 6일째보다 tip cell의 수가 급격히 감소하였다. 형태는 생후 4일, 6일 동맥 혈관과 정맥 혈관에서 달랐고 생후 8일째에서는 혈관이 망막 끝 부분까지 자라 tip cell을 구분하기 어려웠다. 동맥 혈관은 얇고 길게 자랐으며 그 끝의 tip cell 또한 길이가 길었다. 하지만 정맥 혈관은 굵고 혈관 밀도가 높았으며 tip cell의 길이는 짧았다. 또한 4일째와 6일째, 동맥 혈관보다 정맥 혈관에서 tip cell이 더 많이 관찰되었다.

결론: 망막혈관 발달 시기별로 tip cell의 변화를 확인하였으며 혈관재구성이 일어나는 시기에 가장 많은 tip cell이 관찰되었고, tip cell은 동맥보다 정맥에서 더 나타났으며 길이가 더 짧은 형태를 보였다. Tip cell이 망막혈관의 발달시기와, 동맥과 정맥에 따라 수와 형태의 차이를 보이는 것은 망막혈관 발달과 관련이 있을 것으로 생각된다.

주요어 : Tip cell; 혈관 발달(Vascular development); 망막(Retina); 혈관

재구성(Vascular remodeling)

학 번 : 2008-21919

목 차

국문 초록	-----	i
목차	-----	iv
그림 목록	-----	v
서론	-----	1
연구 방법	-----	5
연구 결과	-----	11
고찰	-----	23
참고 문헌	-----	30
영문 초록	-----	36

그림 목록

Figure 1 Hematoxylin & eosin staining and Immunofluorescence staining for PECAM-1 of retina from postnatal day 4, 8, and 12 mouse. ----- -----	13
Figure 2 Immunofluorescence staining for tip cell with PECAM-1, collagen type IV and isolectin B4 from postnatal day 4 mouse retinas. ----- -----	16
Figure 3 Retinal whole mounts staining with isolectin B4 of postnatal day 4 mouse retina and tip cell counting. -----	19
Figure 4 Vascular density and tip cell morphology varied in mouse retina of postnatal day 4, 6, and 8 immunofluorescence stained with isolectin B4. -----	21

서론

1. 망막혈관의 발생

척추동물의 발달단계에서 혈관이 어떻게 분화되고 성장을 하는지를 명확히 알지 못하고 있다(1). 특히 무엇이 조직과 기관들에서 혈관 방향과 위치를 결정하는지, 어떻게 혈관들끼리 연결 또는 가지치기가 결정되는지에 관한 많은 연구가 필요하다. 이와 더불어 동맥과 정맥의 혈관 형태가 어떻게 평행과 병렬로 만들어지는지와 동일 시점에 이루어지는 혈관 분리 및 네트워크 형성 방식에 관한 연구 역시 부족하다(2). 최근에는 형태학적인 신생혈관(angio genesis) 연구나 병적인 신생혈관 연구 그리고 혈관이 만들어져가는 메커니즘과 발달시기를 정형화(patterning)시키는 연구가 많이 진행 중이다. 특히 이러한 연구에 많이 사용하고 있는 조직이 생쥐의 망막이다(3). 특히 생쥐의 망막 혈관발달은 생후직후부터 진행되고 분리된 공간

내에서 혈관 망의 발달이 잘 나타나며 그것을 쉽게 관찰할 수 있다는 것이 특징이다(4, 5).

생쥐 망막혈관이 생성되는 것을 두 가지로 분류하는데, 혈관형성(vasculogenesis)과 신생혈관(angiogenesis)이다. 시신경(optic nerve)에서 뻗어 나와 혈관들이 네트워크를 이루며 망막 표면으로 망을 형성하며 자라는데, 이를 혈관 형성이라고 한다. 이때 혈관은 새로운 혈관 형성세포(angioblast), 전구물질(precursor)을 통해 만들어진다(6-9). 반면 기존에 존재하고 있던 모세혈관으로부터 새로운 혈관이 뻗어나오는데 이를 신생혈관이라고 한다. 정상적인 망막 발달 단계에서는 심층 망막 혈관(deeper retinal vascular plexuse)이 자라나는 것을 신생 혈관 과정이라 하고 있다. 현재 연구가 가장 활발히 진행되고 있는 분야가 이 신생혈관이며 암이나 다른 병적 현상의 경우 많이 발생하고 있어 치료를 위해 많은 연구가 진행 중이다(10-13).

2. 망막혈관 발생 시 Tip cell의 역할 및 형태

망막 혈관 내피세포의 발달은 성상세포(astrocyte)의
형판(template) 위에서 특정 안내 신호를 받아 자라는 것으로
알려져 있다. 성장인자(growth factors)나 혈관 세포 부착
분자(cellular adhesion molecules) 등으로 인해 혈관 내피세포들은
성장 방향을 결정한다. 이때 tip cell과 같은 혈관 끝에 존재하는
세포가 특정 안내신호를 감지하여 방향을 결정해 자라기
시작한다(14). Tip cell은 1930년 처음 관찰되었는데 새끼 도롱뇽
꼬리에 위치한 혈관 끝에서 역동적으로 뻗어 나가는 신생혈관의
이미지를 보고 그 과정을 이해하려는 시도가 있었다. 그 뒤로 발달
단계에서 중추 신경 계통 혈관이 자라면서 tip cell이라 추측되는
곳이 앞으로 뻗어 자라나는 것을 확인하였고, 그 tip cell의
앞부분에는 사상위족(filopodia)이 존재하는 것이 확인되었다.
혈관이 뻗어 나가는 과정 동안 유도 신호에 이끌리는 기능이

사상위쪽에 있을 거라는 생각을 하며 이를 이미지화 시켰다(15, 16). 그 뒤로 사상위측은 혈관이 어디로 이동하며 자라야 하는지를 탐지하는 기능을 가지고 있으며, 그 형태는 유극(polarized)의 모습을 띠고 있다고 보고되었다. 그리고 Gerhardt에 의해 tip cell과 stalk cell로 분류되어 기술하기 시작하였다. 이는 혈관 끝의 모습을 형태적 차이의 개념으로 처음 기술하기 시작한 것이다(17, 18). Gerhardt의 논문에서 혈관 내피세포가 자랄 때 제일 앞부분에 tip cell이 위치하며, 그 모양은 길게 뻗어 존재하고, 증식(proliferation) 하지 않으며, tip cell 끝에 많은 사상위측이 존재하는 것을 tip cell이라 명명하는 반면, stalk cell은 tip cell과 달리 증식을 하고 튜브 모양을 하고 있고, 그 안에 혈액이 지나갈 수 있는 속공간(lumen)이 존재하는 것을 발표하였다(17).

이에 본 연구는 신생 생쥐의 망막혈관 발달 과정 중에 존재하는 tip cell이 어떤 시기에 관찰되며, 시기별로 tip cell의 수가 어떻게 다르고 또 그 형태는 어떤 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

연구 방법

1. 실험 동물

본 연구에서 모든 동물 실험의 관리 및 사용은 안과학 및 시기능의 동물 사용을 위한 ARVO (Association of Research in Vision and Ophthalmology) 규정을 준수하였고, 서울대학교 동물실험윤리위원회(SNUIACUC)의 승인 후 진행되었다.

실험동물로는 C57BL/6J(중앙실험동물, 서울)를 사용하였다.

2. 헤마톡실린-에오신 염색

생후 4일, 8일 12일째에 각각 6 마리씩 안구를 적출 하여서 그 중 오른 쪽 6개의 안구만을 실험에 사용하였다. 안구를 0.1M phosphate buffer saline (PBS) (pH7.4)로 조성된 4%

중성포르말린에 넣고 4℃에서 24시간 이상 고정한 뒤 세척, 파라핀에 포매 시키고 4 μ m 두께로 박절한 뒤, poly-L-lysine이 도포된 슬라이드에 붙였다. 조직 슬라이드를 60℃ oven에 2시간 동안 넣어서 파라핀 성분을 녹인 뒤 식힌 후 연속된 4개의 xylene 용기에 5분씩 각각 반응시키면서 탈 파라핀 시키고, 연속된 2개의 100%, 95%, 80%, 70% ethanol 용기에 5분씩 반응시켜준 뒤 증류수에서 10분간 세척하였다. 그 후에 헤마톡실린-에오신 염색을 하였고, 모든 사진은 광학현미경 (Leica DM IL LED, Leica Microsystems, USA)을 사용하여 촬영하였다.

3. 면역 형광 염색

파라핀에 포매 된 6개의 안구를 4 μ m 두께로 박절한 뒤, 탈 파라핀화 시켜주고 단계별로 ethanol 처리를 해준 뒤 0.1M sodium citrate buffer에 조직 슬라이드를 담근 후 10분 동안 121℃에

넣어 가열한 후 슬라이드가 담긴 용기를 얼음이 담긴 용기에 넣고 실온에서 20분간 식힌다. 그 뒤 PBS에 넣고 5분씩 2회 세척을 하였다. 0.2% Triton X-100을 15분간 처리를 해준 뒤 PBS에 넣고 5분씩 4회 세척을 하였다. 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위해 외인성 단백질 차단 약물 (BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA)을 조직 위에 10분간 처리해준 뒤, PECAM-1 (1:200; 550274, BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA) 항체를 조직에 각각 처리 하였다. 4℃에서 16시간 반응시키고 PBS에 5분씩 2회 세척 한 뒤 이차 항체 Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rat IgG (1:400; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)를 2시간 처리 후, PBS에 5분씩 2회 세척 하였다. Faramount Aqueous mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark)로 고정한 뒤 모든 사진은 형광 현미경 (Leica DM IL LED, Leica Microsystems, USA)을 사용하여 촬영하였다.

4. 전조직표본(wholemout) 망막 면역 형광 염색

총 15마리씩 30개의 안구를 생후 4일, 6일, 8일째 각각 적출하여 사용하였다. 4% 중성포르말린에 30분 고정 후, 각막과 렌즈를 제거하고, 전 층의 망막을 망막 색소 상피층으로부터 분리해 내어 4갈래의 방사형으로 절개하여, PBlec [Phosphate buffered saline (pH6.8), 1% Triton X-100, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.1mM MnCl₂] 용액이 200 μ l 들어있는 2ml tube에 넣었다. 두 시간 반응시킨 뒤 3개의 안구씩 각각 단백질에 특이적인 항체, collagen type IV (1:200; 2150-1470, serotec, Oxford, UK)와 PECAM-1 (1:200; 550300, BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA)을 4℃에서 각각 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 3번 세척 한 후 상온에서 collagen type IV를 사용한 안구 조직에는 Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:200; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), PECAM-1을 사용한 안구 조직에서는 Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:200; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)를 2시간 동안 반응 시켰다. PBS로 3번 세척 한 후에 collagen type IV와 PECAM-1이 염색된 조직에 추가로 Isolectin GS-IB4 Alexa

Fluor 568 (1:250; I21412, Invitrogen, USA)를 4℃에서 각각 16시간 동안 반응시켰다. 망막을 PBS로 5번 세척 한 후 Faramount Aqueous mounting medium(Dako, Glostrup, Denmark)로 고정한 후, 제작된 표본을 형광 현미경(Leica DM IL LED, Leica Microsystems, USA)을 사용하여 12개 구획으로 분할 촬영하였다(x50). 사진을 모두 합쳐 파노라마 사진으로 제작한 후 안구 전체의 모습을 확인하였고, tip cell의 형태와 수를 관찰하기 위해 한 면당 4~6장씩 총 4개 면을 나누어 촬영(x200)하였다. 이 사진을 각 면당 합쳐 파노라마 사진으로 제작하여 혈관 발달 상태를 관찰하고 tip cell를 개수하였다. Tip cell 개수는 Isolectin GS-IB4만을 염색한 조직을 사용하였고, 안구는 생후 4일, 6일, 8일째 각각 18개씩 사용하였다. Tip cell 마커로 사용하기 위해 안구 3개씩을 각각 사용하여 Dll4 (1:200; ab7280, abcam, Cambridge, UK)와 VEGF Receptor 2 Rabbit mAb (1:200; 55B11, Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA)를 가지고 실험을 하였으나 염색이 되지 않아 결과에 넣지 않았다.

5. 이미지 분석 및 통계 분석

염색된 망막 사진 각각을 Photoshop(version 6; Adobe Systems Inc., San Jose, California, USA)을 이용하여 조합한 후 tip cell의 숫자를 분석하였다. GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA)을 사용하여 t-test 및 표준오차를 측정, 그에 따른 그래프를 만들었다.

연구 결과

1. 망막혈관의 발생 양상

생후 4일째 쥐 망막을 보면 신경절세포(ganglion cell)층이 형성되어있고, 내핵 층(inner nuclear layer)과 바깥 핵 층(outer nuclear layer)은 아직 분리되지 않았음을 확인할 수 있었다(Figure 1). 망막 표피 상의 혈관망(superficial vascular plexus) 형태를 보면, 생후 4일째 시신경에서 망막 중앙 부위까지 혈관이 자라나는 것을 확인할 수가 있고, 다른 혈관 층인 심층 망막 혈관망(deeper retinal vascular plexuse)이나 중간층 망막 혈관망(intermediate vascular plexus)은 아직 형성되지 않았음을 알 수 있었다(Figure 1A-C). 8일째에 접어들면서 바깥 핵 층의 발달과 함께 내핵층이 분리 되었다(Figure 1). 시신경에서 망막의 말단 부위까지 망막 표피 상의 혈관 망이 형성된 것을 확인할 수 있었고, 심층 망막 혈관 망이 형성되기 시작하였다(Figure 1D-F). 생후 12일째가 되면 망막의 모든 층이 완성 되었고(Figure 1),

특히 망막 표피 상의 혈관 망과 심층 망막 혈관 망이 망막 말단 부위까지 형성됨을 발견할 수 있었다. 그러나 중간층 망막 혈관 망의 경우 여전히 형성되어가는 과정에 있음을 확인할 수 있었다(Figure 1G-I). 혈관 발생 시 tip cell을 관찰할 수 있는 위치는 망막 표피 상의 혈관망 부위이며, 그 위치에서 tip cell이 관찰되는 시기는 생후 8일째까지인 것으로 확인된다.

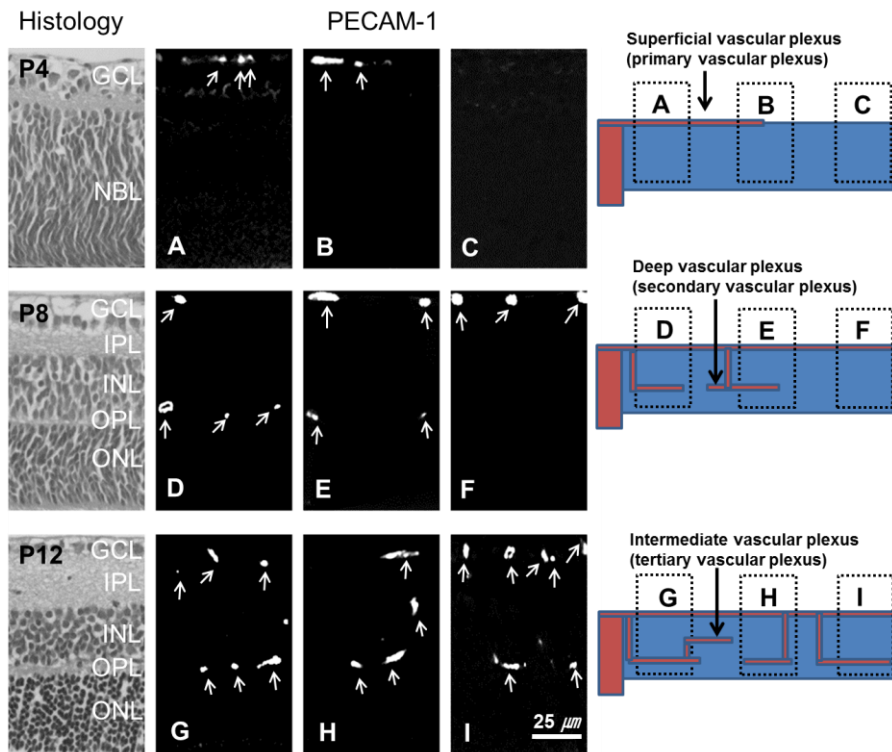


Figure 1. Hematoxylin & eosin staining and Immunofluorescence staining for PECAM-1 of retina from postnatal day 4, 8, and 12 mouse.

Postnatal day 4, NBL is not yet differentiated into the inner and outer nuclear layer. A-C: Spreading of superficial vascular plexus proceeds from the optic disc to the midperiphery. Postnatal day 8, Inner nuclear layer and outer nuclear layer of the retina can be identified. D-F: Superficial plexus has fully extended to the peripheral retina. Vascular branches also sprouted vertically to form the deep vascular plexus. Postnatal day 12, all of the retinal layers are

developed. G-I: Deep vascular plexus in the outer plexiform layer formed rapidly and reached the retinal periphery at postnatal day 12. Also intermediate vascular plexus in the inner plexiform layer extended to midperiphery. Arrow is blood vessel from A to I. GCL, ganglion cell layer; NBL, neuroblast layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. , Scale bar, 25 μm

2. PECAM-1, collagen type IV, isolectin B4를 이용한 tip cell 염색

혈관을 염색하는 항체들로 잘 알려져 있는 PECAM-1, collagen type IV, isolectin B4로 tip cell를 염색하였다. PECAM-1과 collagen type IV 항체를 이용하여 염색한 결과, 혈관은 염색이 잘 되지만 혈관 끝에 존재하는 tip cell은 염색이 잘 되지 않았다. 반면 isolectin B4 항체는 혈관뿐만 아니라 화살표로 표시한 tip cell과 화살표 머리가 가리키는 사상위족(filopodia)까지 염색이 잘 되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2A-B).

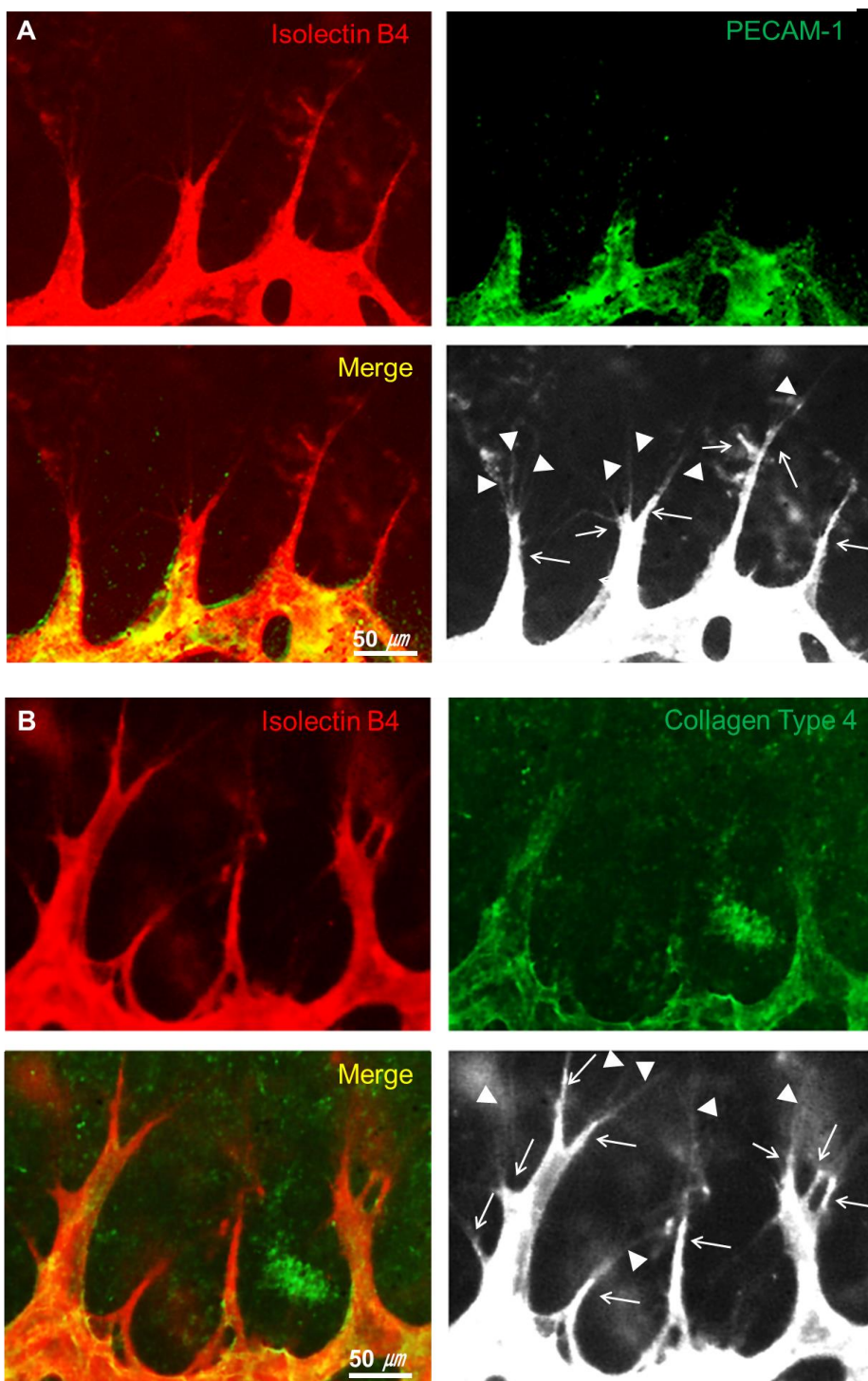


Figure 2. Immunofluorescence staining for tip cell with PECAM-1, collagen type IV and isolectin B4 from postnatal day 4 mouse retinas.

A: Retinal sections from postnatal day 4 were stained for tip cells with isolectin B4 and PECAM-1. Isolectin B4 stained tip cells while PECAM-1 weakly stained. B: Again, isolectin B4 stained the tip cells while collagen type IV staining weakly. Arrows indicate is tip cells. Arrow heads indicate filopodia. Scale bar, 50 μm

3. 전조직표본(wholemout) 망막 면역 형광 염색 및 tip cell 개수

생후 4일된 안구의 망막 혈관을 isolectin B4 항체로 염색한 후에, tip cell을 관찰하였다(Figure 3A). 전체 망막 중에 tip cell 부위를 확대 관찰한 후 tip cell을 개수하였다. 그림에서와 같이 화살표는 tip cell이고, 화살표 머리는 사상위족(filopodia)이다(Figure 3B). 생후 4일 17개 안구, 6일 15개 안구, 8일째 15개 안구를 사용하여 각 시기별로 tip cell의 수를 세어본 결과, 생후 4일째보다 생후 6일째 tip cell의 수가 증가를 하였으나, 생후 8일째는 생후 6일째보다 tip cell의 수가 급격히 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 3C, P4, 165.2 ± 10.1 ; P6, 183.8 ± 19.4 ; P8, 21.4 ± 6.4 , $*P < 0.05$).

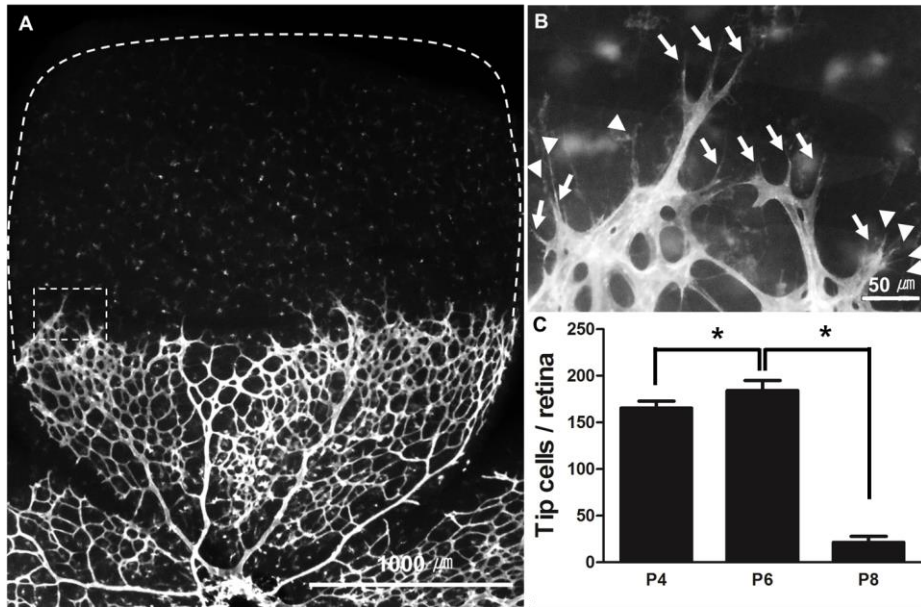


Figure 3. Retinal whole mounts staining with isolectin B4 of postnatal day 4 mouse retina and tip cell counting.

A: The pattern of the tip cell growth at postnatal day 4 mouse retina was observed with isolectin B4 whole mount staining. B: We defined tip cell as a cell with bundle of filopodia off of its tip not each filopodia itself. Arrows indicate is tip cells. Arrow heads indicate filopodia. C: The number of tip cells was counted at P4, P6 and P8 (165.2 ± 10.1 at P4, 183.8 ± 19.4 at P6 and 21.4 ± 6.4 at P8, $*P < 0.05$). The number was the highest at P6 and the number decreased dramatically at P8. Scale bar: (A) $1000 \mu\text{m}$; (B) $50 \mu\text{m}$.

4. Tip cell의 형태학적 관찰

혈관은 생후 4일, 6일째 망막 표피상의 혈관망(superficial vascular plexus)층에서 망막의 중간 부위까지 자란 것을 확인할 수 있었고(Figure 4A-B), 8일째에는 망막의 끝까지 혈관 망이 자란 것을 확인할 수 있었다(Figure 4C). 특징적인 부분은 같은 시기에 존재하는 tip cell들의 형태가 동맥 혈관과 정맥 혈관에서 각기 다른 것을 확인할 수 있었다. 생후 4일째, 6일째에 동맥 혈관은 그 굵기가 얇고 tip cell의 길이 또한 길었다(Figure 4D-E). 반면 정맥 혈관은 혈관의 굵기가 굵고 밀도가 높으며, tip cell 길이는 짧은 모양을 한 것을 확인할 수 있었다(Figure 4F-G). 4일째와 6일째 동맥보다 정맥에서 더 많은 tip cell을 관찰할 수 있었다(Figure 4H, P4, 동맥: 74.2 ± 10.4 , 정맥: 91.0 ± 9.2 ; P6, 동맥: 79.8 ± 11.3 , 정맥: 104.0 ± 10.2 , $*P < 0.05$).

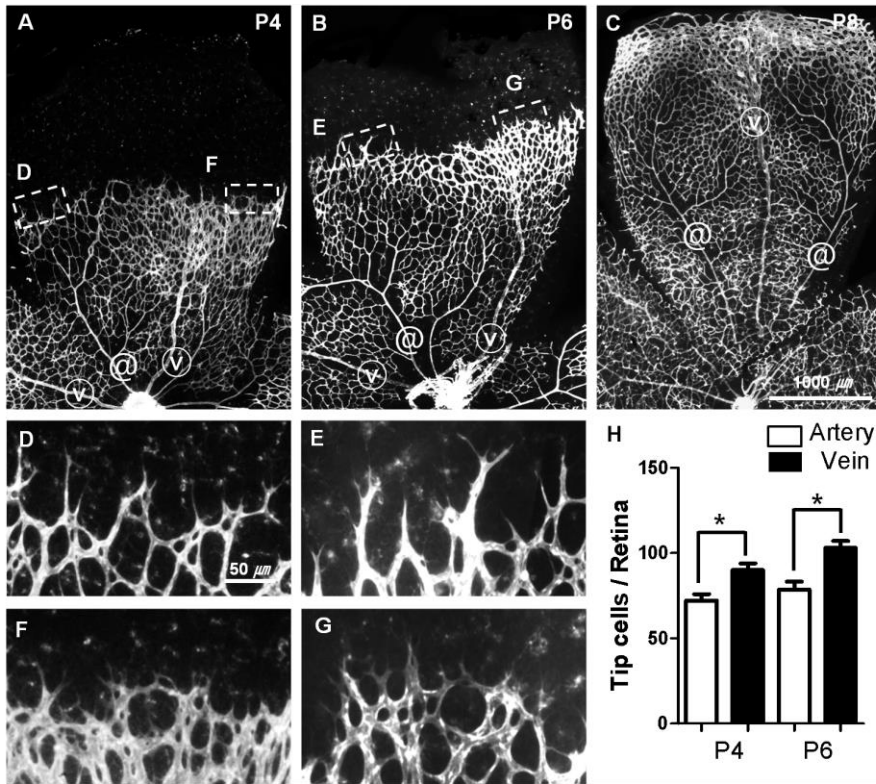


Figure 4. Vascular density and tip cell morphology varied in mouse retina of postnatal day 4, 6, and 8 immunofluorescence stained with isolectin B4.

A: Different vascular plexus densities were observed within postnatal day 4 mouse retina. Boxed regions are shown at higher magnification in D and F.

B: Superficial vascular plexus to ganglion cell layer extends to reach halfway of the retina by postnatal day 6. Boxed regions are shown at higher magnification in E and G. C: At postnatal day 8, vascular plexus extends to the edge of the retina. D-E: Tip cell length was long and vascular density was

low at the end of arteries. F-G: On the other hand, tip cells were shorter and the vascular density was higher at the end of veins. H: At postnatal day 4 and 6, the number of tip cells in veins was greater than that in arteries(Figure 4H, P4, artery: 74.2 ± 10.4 , vein: 91.0 ± 9.2 ; P6, artery: 79.8 ± 11.3 , vein: 104.0 ± 10.2 , $*P < 0.05$). @, artery; (v),vein. Scale bar: (A-C) 1000 μm ; (D-G) 50 μm .

고 찰

본 연구에서는 발달시기에 망막혈관이 자라면서 혈관 앞에 존재하는 tip cell이 어떤 형태로 존재하는지 시기별로 수의 차이가 있는지 알아보고자 하였다. 그래서 면역 형광 염색을 통해 언제 tip cell을 관찰해야 하는지, 어떤 항체를 가지고 tip cell을 염색하여 실험해야 할 것인지를 확인하였다. 그리고 혈관 밀도에 따라 tip cell 모양이 어떻게 다른지 확인하였다.

우선 tip cell을 연구하는 데 있어서 tip cell만을 염색시킬 수 있는 항체를 사용해야 하는데, 아직은 tip cell만을 염색할 수 있는 항체는 존재하지 않는다. 그래서 본 실험에서는 혈관 염색에 널리 사용하고 있고, tip cell이라 언급하며 사용된 PECAM-1, collagen type IV, isolectin B4, Dll4, VEGF Receptor 2 항체들을 가지고 실험하였다(17, 30, 32). 하지만 Dll4와 VEGF Receptor 2는 염색이 되지 않아서 결과에 넣지 않았다.

PECAM-1과 collagen type IV는 혈관을 잘 염색시키는 반면 tip cell과 그에 나타나는 사상위족(filopodia)까지는 염색하지 못함을 확인할 수 있었다. 그러나 isolectin B4 항체는 tip cell과 그에 존재하는 사상위족까지 염색하는 모습을 보여 tip cell을 관찰 및 개수하는데 isolectin B4 항체를 사용하였다. 일반적인 혈관 염색에 널리 사용되는 PECAM-1은 내피세포와 혈소판, 단핵 백혈구, 호중구(neutrophils), 그리고 몇몇 타입의 T-cell까지 염색하는 것으로 알려졌고, 결합 조직(connective tissue), 기저 막(basement membrane)과 피부의 편평 상피(squamous epithelium)에는 염색이 되지 않는다고 보고된 바 있다(19). collagen type IV는 혈관의 기저 막(basement membrane)과 세포 외기질(extracellular matrix)을 염색하는데 널리 사용되고 있다(20). GS isocletin B4 항체는 Griffonia simplicifolia라고도 불리는데, 콩 과류 식물의 lectin에서 추출한 물질이다(21, 22, 23). 이것은 다당류(polysaccharide)와 단백질(glycoprotein)의

잔여물인 α -D-galactosyl과 결합하는데 이것으로 인해 PECAM-1이나 collagen type IV 항체보다 tip cell 염색을 잘할 수 있게 하는 것으로 예상된다.

혈관이 자라게 되는 혈관 층에서는 같은 내피세포들끼리 관 모양을 만들면서 앞으로 뻗어 나가며 혈관을 형성한다. 전 조직표본 망막 면역 형광 염색을 통해 생후 4일째 망막 표면에 혈관이 자라나는 모습을 살펴보면, 시신경에서부터 자라나는 혈관은 마치는 나뭇가지와 같은 모습을 하고 중앙을 향하여 방사형으로 자라는 모습을 하고 있으며 밀도는 대체로 낮음을 확인할 수 있었다. 하지만 같은 시기 정맥 혈관과 같이 점점 밀도가 높아지는 부위 또한 발견할 수 있었다. 앞서 연구된 보고에 의하면, 생후 3일째부터 8일째까지, 망막 혈관의 동맥과 정맥 사이로 모세혈관들의 혈관 재구성(vascular remodeling)이 시작되어 재정립이 이루어진다고 보고된 바 있으며, 이때 불필요한 혈관은 혈관 재구성의 과정을 거쳐 사라지게 되고 어떤 혈관의 경우 그

기능에 맞는 혈관으로 변하게 되는 과정인 가지치기(pruning)라는 것을 통해 혈관들이 조정된다고 한다(5, 24). 또 혈관 재구성은 새로운 혈관 성장에 관여하는데, 혈관 속공간(lumen)의 지름과 혈관 벽의 두께 또한 변화가 생긴다. 처음에는 작은 면적인 0.5mm에서 2.5mm 사이의 지름으로 시작하여, 점점 큰 면적으로 자라게 된다(25). 또 속공간(lumen)을 관통하는(transluminal) 기둥과 같은 형태로 혈관이 자라기도 한다(26, 27). 혈관 재구성은 혈관의 방향과 혈류의 흐름, 혈관 주위 세포(pericyte)와 연성 근육 세포(smooth muscle cell), 그리고 주변세포에서 영양분의 요구가 있을 경우 일어난다. 이때 혈관 밀도의 조정이 일어나며 크고 작은 혈관들에 변화가 생기고, 이런 과정에서 속공간이 만들어진다. 혈관은 재구성되는 목적과 이유에 따라 뺄어 나가기도 하고 없어지기도 하며, 때에 따라서는 혈관 끼리 서로 합쳐지면서 혈관이 연결되고 점차 안정 된다(28). 또한, 동맥 혈관과 정맥 혈관의 밀도 차이를 혈관 재구성뿐만 아니라 분자기적 관점을 통해 설명한 것을

보면, 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor)의 자극으로 인해 혈관의 증식(proliferation)과 이동(migration)의 영향을 받는다는 보고가 있다(32). 정맥 혈액 때문에 낮은 산소 농도로 성상세포(astrocyte)로부터 공급되는 혈관내피세포 성장인자가 정맥 혈관 주변으로 많이 발생 된다. 반면에 동맥 혈관에는 적거나 거의 존재하지 않는다(30, 32). 이런 다른 농도의 혈관내피세포 성장인자로 인해 동맥 혈관과 정맥 혈관의 재구성과 각혈관 끝에 존재하는 tip cell에 영향을 주게 되는데, 이 때문에 정맥 혈관은 많은 증식 인자들로 인해 혈관 굵기가 두꺼워지고 tip cell의 길이가 짧아지게 되며, 동맥 혈관은 그 굵기가 얇고 길며 tip cell의 길이가 길게 된다(29).

본 실험에서는 더 나아가 각 시기별로 tip cell의 수를 개수하여 tip cell의 변화를 관찰 하였다. 혈관 재구성이 한참 일어나는 시기인 6일째에 tip cell의 수가 증가함을 확인하였고, 그 수 또한 동맥보다 정맥에서 더욱 증가한 것을 확인 하였다. 이런 결과들을

바탕으로 정리를 해보면, 동맥의 혈관망 선두에 존재하는 tip cell의 역할은 혈관 확장이 목표이기 때문에 그 모양이 길고 앞으로 뻗어있는 형태를 보이며, 혈관 재구성이 일어나는 부위인 정맥에서는 동맥 및 다른 주변에 있는 혈관들과의 연결 및 융합을 쉽게 하기 위해 tip cell의 길이가 짧고 많이 존재하는 것이 아닌가 추측된다.

이번 실험에서는 tip cell의 시기별 형태와 개수의 차이만을 관찰하였기 때문에 어떤 분자기적 신호로 tip cell이 영향을 받는지는 알 수 없었다. 그리고 tip cell 만을 염색시키는 마커가 없기 때문에 tip cell을 개수하는데 명확한 기준이 필요했다. 그래서 기존 논문에서 발표된 tip cell을 정의한 기준을 가지고, 발달 과정에 있는 혈관 끝에 존재하는, 많은 사상위족(filopodia)을 가지고 있는 부위를 tip cell이라 정하고 개수를 하였다(17, 31). 또한 동맥과 정맥 혈관을 구별하는 항체가 존재하지 않기 때문에 tip cell의 수를 분리해서 개수 할 때 기준이 필요했다. 정맥에

존재하는 tip cell 분지의 굵기의 범위는 $15\sim 20\mu\text{m}$ 였고, 동맥에 존재하는 tip cell의 굵기의 범위는 $5\sim 10\mu\text{m}$ 의 굵기로 존재하는 것을 확인하였다. 그래서 정맥이 시작되는 부위에서 찾아 올라가 존재하는 혈관의 굵기가 $20\mu\text{m}$ 정도에 tip cell 끝에 두개 이상의 짧은 분지가 존재하는 것을 정맥에 속한 tip cell이라 정하였다. 그리고 동맥이 시작되는 부위에서 찾아 올라가 존재하는 혈관 굵기가 $5\sim 10\mu\text{m}$ 로 존재하며 혈관끝이 길고 분지가 없는 것을 동맥에 속한 tip cell이라고 정하였다. 이렇게 형태적 차이로 구별할 수 밖에 없었던 것은 앞으로 개선되어야 할 점인 것 같다.

후속 연구에서는 분자기적인 접근을 통해서 혈관 발달시 tip cell이 어떻게 이동하며 성장하는지 그리고 어떤 것에 의해 영향을 주고 받는지 연구 할 필요가 있고 또 stalk cell에 속공간이 어떻게 생성되는지 그 원리를 밝히는 것 또한 필요할 것으로 보인다. 이는 앞으로 신생혈관의 생성원리를 이해하고 병적 신생혈관을 치료하는데 많은 도움이 될 것으로 예상된다.

참고 문헌

1. Roman BL, Weinstein BM. Building the vertebrate vasculature: research is going swimmingly. *Bioessays*. 2000; 22(10):882-93.
2. Isogai S, Lawson ND, Torrealday S, Horiguchi M, Weinstein BM. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*. 2003;130(21):5281-90.
3. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(6):2813-26.
4. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci*. 1995;15(7):4738-47.
5. Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. Retinal vascular development

- is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(11):3500-10.
6. Gerhardt, H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis.* 2008;4(4):241-6.
7. McLeod DS, D'Anna SA, Luty GA. Clinical and histopathologic features of canine oxygen-induced proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(10):1918-32.
8. Taomoto M, McLeod DS, Merges C, Luty GA. Localization of adenosine A2a receptor in retinal development and oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(1):230-43.
9. Chan-Ling T, McLeod DS, Hughes S, Baxter L, Chu Y, Hasegawa T, et al. Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(6):2020-32.
10. Engerman R, Meyer R. Development of retinal vasculature in rats.

Am J Ophthalmol. 1965;60(4):628-41.

11. ASHTON N. Retinal angiogenesis in the human embryo. Br. Med. Bull. 1970;26(2):103-6.

12. Chan-Ling T, Halasz P, Stone J. Development of retinal vasculature in the cat: processes and mechanisms. Curr Eye Res. 1990;9(5):459-78.

13. Gariano RF, Iruela-Arispe ML, Hendrickson AE. Vascular development in primate retina: comparison of laminar plexus formation in monkey and human. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35(9):3442-55.

14. McClay DR. The role of thin filopodia in motility and morphogenesis. Exp Cell Res. 1999;253(2):296-301.

15. Mato M, Ookawara S. Ultrastructural observation on the tips of growing vascular cords in the rat cerebral cortex. Experientia. 1982;38(4):499-501.

16. BAR, T. H.; WOLFF, J. R. The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. Z

Zellforsch Mikrosk Anat. 1972;133(2):231-48.

17. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. J Cell Biol. 2003;161(6):1163-77.

18. Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. Dev Biol. 2012;372(2):157-65.

19. Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. Dev Cell. 2009;16(2):222-31.

20. Patan S, Haenni B, Burri PH. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. Microvasc Res. 1996;51(1):80-98.

21. Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. Circ Res. 2000;86(3):286-92.

22. Patan S, Munn LL, Tanda S, Roberge S, Jain RK, Jones RC.

Vascular morphogenesis and remodeling in a model of tissue repair: blood vessel formation and growth in the ovarian pedicle after ovariectomy. *Circ Res.* 2001;89(8):723-31.

23. Leong AS, Vinyuvat S, Suthipintawong C, Milios J. A comparative study of cell proliferation markers in breast carcinomas. *Clin Mol Pathol.* 1995;48(2):M83-7.

24. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech.* 2008;71(5):357-70.

25. Lemaire PA, Adosraku RK. An HPLC method for the direct assay of the serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan, in seeds of *Griffonia simplicifolia*. *Phytochem Anal.* 2002;13(6):333-7.

26. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.

27. Hallmann R, Feinberg RN, Latker CH, Sasse J, Risau W. Regression

of blood vessels precedes cartilage differentiation during chick limb development. *Differentiation*. 1987;34(2):98-105.

28. Latker CH, Kuwabara T. Regression of the tunica vasculosa lentis in the postnatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;21(5):689-99.

29. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis*. 2008;4(4):241-6.

30. Claxton S, Fruttiger M. Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature. *Dev Dyn*. 2005;233(3):822-8.

31. Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(9):551-64.

32. Ehling M, Adams S, Benedito R, Adams RH. Notch controls retinal blood vessel maturation and quiescence. *Development*. 2013;140(14):3051-61.

Abstract

Introduction: Retinal vascular development is characterized by gradual growth from the optic nerve to the end of the retina. In particular, tip cells drive the developmental process of retinal vessels. This study was to investigate chronological changes of tip cells during the development of retinal vasculature in newborn mice.

Method: Histological evaluation and immunohistochemistry with antibody to PECAM-1 were performed with paraffin sections prepared from the eyes of mice at postnatal day (P) 4, 8, and 12 to demonstrate the pattern of retinal vascular development. Then, we compared staining patterns of tip cells and their filopodia among whole-mount retinal tissues from mice at P4, 6, and 8 stained with antibodies to PECAM-1, collagen type IV, and isolectin B4. Furthermore, quantitative and morphological analyses of tip cells were performed with isolectin B4-stained whole-mount retinal tissues.

Result: Tip cells could be observed until P8 when retinal vessels reached to the end of the retina at the level of superficial vascular plexus. From tested primary antibodies, those to isolectin B4 evidenced to demonstrate the most reliable results of identification of tip cells and their filopodia. Interestingly, the number of tip cells was the highest at P6 (183.8 ± 19.4 per eye) and decreased dramatically from P6 to P8 (21.4 ± 6.4 per eye). According to the origin of tip cells, they demonstrate differential morphological characteristics: tip cells at the end of arteries are longer and thinner than those at the end of veins.

Conclusion: Our results show that tip cells demonstrate differential quantitative and morphological patterns in the development of retinal vasculature.

Key word: Tip cell; Vascular development; Retina; Vascular remodeling